

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462341

研究課題名(和文) Notchシグナル下流因子HEY1制御による骨軟部腫瘍転移抑制

研究課題名(英文) Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 promotes osteosarcoma metastasis via matrix metalloproteinase 9 expression

研究代表者

山元 拓哉 (Yamamoto, Takuya)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40381157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨肉腫におけるNotchシグナル阻害下流因子の検討を行ったところ、HEY1の発現の上昇を認めた。HEY1ノックダウンにより細胞浸潤能は低下し、HEY1を過剰発現すると細胞浸潤能が促進した。HEY1ノックダウンにより活性型MMP9の発現が低下した。またヒト骨肉腫細胞株および骨肉腫患者生検組織においてMMP9の発現しており、HEY1ノックダウンした骨肉腫細胞株に活性型MMP9を加えると、細胞浸潤能が回復した。骨肉腫細胞マウス Xenograft Modelでは、HEY1ノックダウンにより肺転移巣が減少した。HEY1の制御は骨肉腫の浸潤、転移を制御する分子治療ターゲットとなることが示唆された。

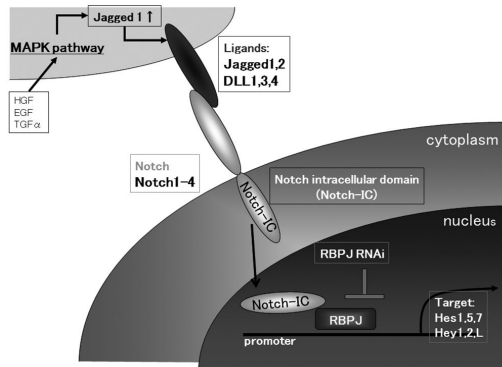
研究成果の概要(英文)：Activation of the Notch pathway has been reported in various types of cancers. However, the role of the hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 (HEY1) in osteosarcoma is unknown. HEY1 was upregulated in human osteosarcoma. Knockdown of HEY1 inhibited the invasion of osteosarcoma cell lines. In contrast, the forced expression of HEY1 increased the invasion of mesenchymal stem cell. In addition, lung metastases were significantly inhibited by the knockdown of HEY1. We found that MMP9 was a downstream effector of HEY1 that promotes the invasion of osteosarcoma cells. Knockdown of HEY1 decreased the expression of MMP9. Addition of MMP9 rescued the invasion of osteosarcoma cells that had been rendered less invasive by knockdown of HEY1 expression. Our findings suggested that HEY1 augmented the metastasis of osteosarcoma via upregulation of MMP9 expression. Inhibition of HEY1 may be a novel therapeutic strategy for preventing osteosarcoma metastasis.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 Notch HEY1 転移

1. 研究開始当初の背景

Notchシグナルは胎生期において重要な増殖因子で幹細胞の維持・増殖や、中枢神経系・造血・筋、体節などの発生に関与していることが知られている。一方でNotchシグナルの異常活性化が血液系悪性腫瘍、脳腫瘍、乳癌、肺がん、肝臓癌、などの多くの悪性腫瘍に関連していることも報告されている。我々はこれまでに Notch シグナル下流転写因子である RBPJ をターゲットとして阻害すると、in vitro, in vivo において骨軟部肉腫の増殖抑制作用を示すことを報告した(下図)。



(Notchシグナルの活性化による RBPJ の下流因子転写)

骨軟部肉腫における Notch シグナルの下流因子の機能に関する詳細な研究は申請者らが調べた限り皆無である。

2. 研究の目的

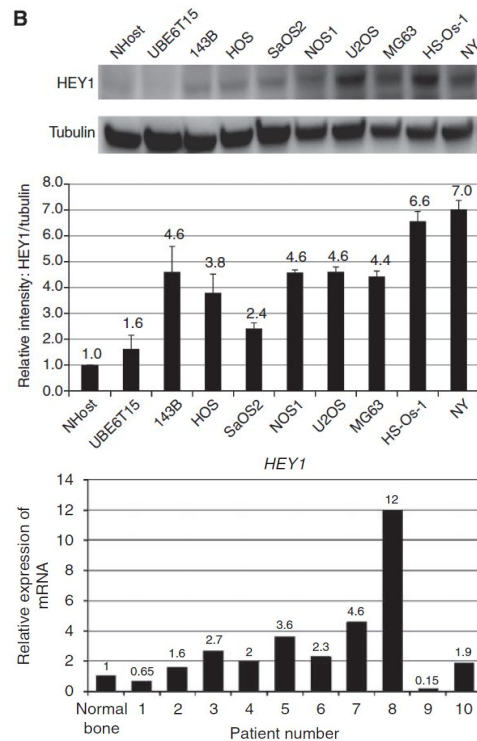
申請者らは Notch シグナル下流因子である hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif (HEY1) の下流で細胞の浸潤能の低下に関与する遺伝子の発現が変化することを preliminary なデータながら明らかとしている。この遺伝子は細胞の増殖・浸潤能に深く関与している重要シグナルの分子である。Notchシグナルによるこれら遺伝子の発現制御メカニズムを詳細に解析し、Notchシグナルによる細胞浸潤・転移能を制御する分子メカニズムを明らかとすることで骨軟部肉腫の新規分子標的治療法の確立に貢献するための研究を行う。

3. 研究の方法

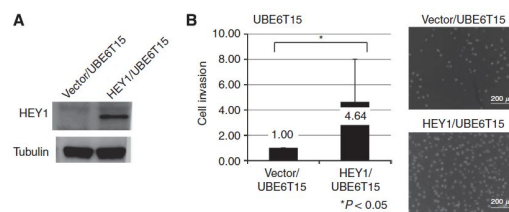
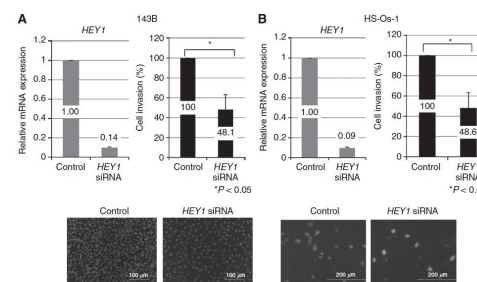
- (1) Notch シグナル下流因子の機能解析のために骨軟部肉腫細胞株で HEY1 をノックダウンして浸潤・転移能を in vitro, in vivo で検討した。
- (2) HEY1 を間葉系幹細胞に強制発現させて細胞移動・浸潤能への影響を検討した。
- (3) HEY1 により、発現や活性が制御される遺伝子を骨軟部肉腫細胞株で活性制御・ノックダウンして細胞転移能を in vitro, in vivo で検討することによりそれら遺伝子の機能を解明。
- (4) 上記すべての遺伝子の活性を臨床検体で検討して化学療法の効果・予後予測応用の検討。

4. 研究成果

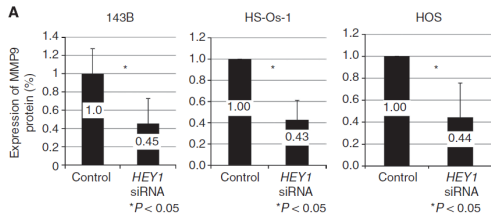
(1) 定量的 PCR 法でヒト骨肉腫細胞株および骨肉腫患者生検組織における Notch 関連遺伝子の発現変化を検討し、正常骨芽細胞と比較して HEY1 の発現の上昇を認めた。



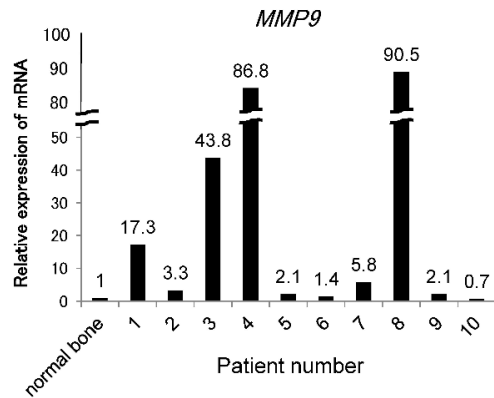
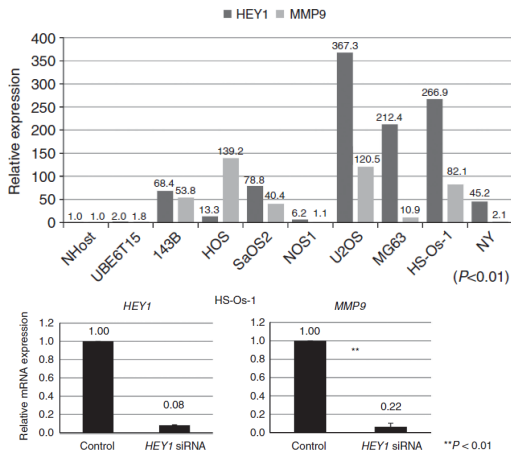
(2) Membrane assay で、HEY1 ノックダウンにより細胞浸潤能は低下し、HEY1 を過剰発現すると細胞浸潤能が促進した。



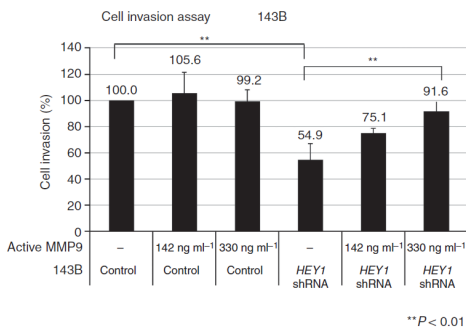
(3) HEY1 ノックダウンによる細胞浸潤に関与する遺伝子の変化を検討した結果、matrix metalloproteinase 9 (MMP9) の発現の低下を認め、HEY1 ノックダウンにより活性型 MMP9 の発現が低下した。



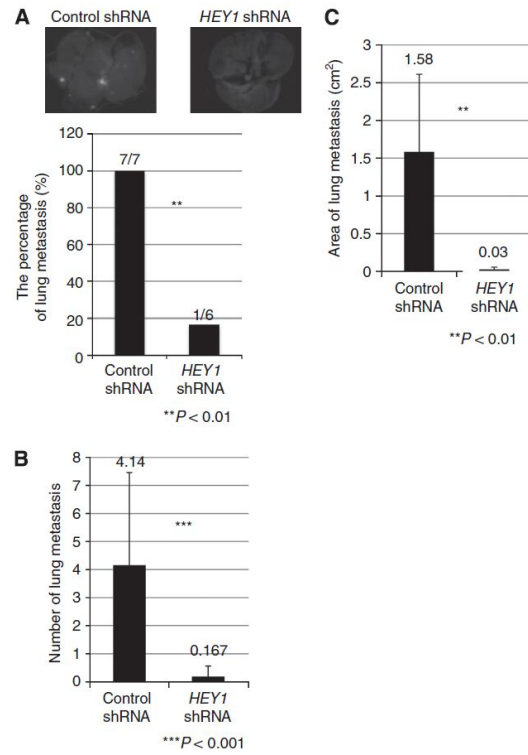
(4) 定量的PCR法にてヒト骨肉腫細胞株および骨肉腫患者生検組織においてMMP9の発現が亢進していた。



(5) Membrane assayにてHEY1ノックダウンした骨肉腫細胞株に活性型MMP9を加えると、細胞浸潤能が回復した。



(6) 骨肉腫細胞マウス Xenograft Model では、HEY1ノックダウンにより肺転移量が減少した。



骨肉腫細胞の浸潤、転移にはNotchシグナルの下流遺伝子であるHEY1がMMP9を介して関与していることが示された。現在、骨肉腫におけるHEY1によるMMP9の発現亢進メカニズムの解析を行っている。HEY1の制御は骨肉腫の浸潤、転移を制御する分子治療ターゲットとなることが示唆された。本研究成果は骨軟部腫瘍領域で新しい発見であり、今後の分子標的治療ターゲットとして期待できるのでさらなる研究が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) Combination of Hedgehog inhibitors and standard anticancer agents synergistically prevent osteosarcoma growth.

Saitoh Y, Setoguchi T, Nagata M, Tsuru A, Nakamura S, Nagano S, Ishidou Y, Nagao-Kitamoto H, Yokouchi M, Maeda S, Tanimoto A, Furukawa T, Komiya S. Int J Oncol. 2016 Jan;48(1):235-42.

(2) Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 promotes osteosarcoma metastasis via matrix metalloproteinase 9 expression.

Tsuru A, Setoguchi T, Matsunoshita Y,

Nagao-Kitamoto H, Nagano S, Yokouchi M, Maeda S, Ishidou Y, Yamamoto T, Komiya S. Br J Cancer. 2015 Mar 31;112(7)

(3) GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma.

Nagao-Kitamoto H, Nagata M, Nagano S, Kitamoto S, Ishidou Y, Yamamoto T, Nakamura S, Tsuru A, Abematsu M, Fujimoto Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S, Setoguchi T.

Int J Cancer. 2015 Mar 15;136(6):1276-84.

(4) Ribosomal protein S3 regulates GLI2-mediated osteosarcoma invasion.

Nagao-Kitamoto H, Setoguchi T, Kitamoto S, Nakamura S, Tsuru A, Nagata M, Nagano S, Ishidou Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S. Cancer Lett. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):855-61.

〔学会発表〕(計1件)

Role of HEY1 and MMP9 in osteosarcoma metastasis

Tsuru A., Setoguchi T., Matsunoshita Y., Nagano S., Komiya S.

19th International Charles Heidelberger Symposium Cancer Research
2013, 2

6. 研究組織

(1)研究代表者

山元 拓哉 (YAMAMOTO Takuya)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：30178371

(2)研究分担者

瀬戸口 啓夫 (SETOGUCHI Takao)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：40381157

小宮 節郎 (KOMIYA Setsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30178371

永野 聡 (NAGANO Satoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：50373139

(3)連携研究者

()

研究者番号：